



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**HIDATIDOSIS: ANTÍGENOS UTILIZADOS
PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO.**

Autor: Sardá Guillén, Ana.

Fecha: Julio 2020

Tutor: Cuesta Bandera, Carmen.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	
3.1 <i>Echinococcus granulosus</i>	4
3.2 Ciclo biológico de <i>Echinococcus granulosus</i>	4
3.3 Morfología y clasificación del quiste hidatídico.....	5
3.4 Hidatidosis.....	6
3.4.1 Epidemiología.....	6
3.4.2 Aspectos generales.....	7
3.4.3 Manifestaciones clínicas.....	7
3.4.4 Diagnóstico.....	8
3.4.5 Tratamiento.....	9
4. OBJETIVOS.....	9
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Antígenos utilizados para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis.....	10
6.1.1 Antígenos del líquido hidatídico.....	10
6.1.2 Antígeno B.....	11
6.1.3 Antígeno 5.....	13
6.2 Estandarización del serodiagnóstico de la hidatidosis humana.....	14
6.3 VIRapid® HYDATIDOSIS.....	16
7. CONCLUSIONES.....	17
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

1. RESUMEN

La hidatidosis es una zoonosis helmíntica mundialmente distribuida causada por las etapas larvarias de *Echinococcus granulosus*. En humanos es una enfermedad crónica que cursa con el crecimiento de quistes hidatídicos en el interior de diferentes órganos, principalmente en el hígado y en los pulmones. Debido al lento crecimiento de los quistes y a las características de la enfermedad, el diagnóstico se realiza habitualmente una vez la enfermedad se torna sintomática, mediante las pruebas de imagen y serología. Actualmente ELISA e inmunoblotting son las técnicas más fiables con fines diagnósticos. Estas se basan en la detección de anticuerpos específicos frente al líquido hidatídico, al antígeno B o al antígeno 5, principalmente. Sin embargo, el uso de estas fuentes antigénicas conduce a un elevado porcentaje de falsos positivos y negativos. Para mejorar el diagnóstico y la estandarización de los tests, se han obtenido proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales y otros extractos antigénicos que podrían solucionar los problemas asociados al uso de los antígenos convencionales en los ensayos inmunológicos.

Palabras clave: Hidatidosis, *Echinococcus granulosus*, antígeno, anticuerpo, serodiagnóstico, sensibilidad, especificidad, ELISA, inmunoblot.

2. ABSTRACT

Hydatidosis is a helminthic zoonosis disease worldwide geographic distributed caused by the larval stage of *Echinococcus granulosus*. In humans is a chronic disease that goes with the growth of hydatid cyst in many internal organs, mainly liver location. Due to its long term growth and the characteristics of the disease, the diagnosis is made when the disease becomes symptomatic through imaging and serology techniques. At present, ELISA and immunoblotting are the most certain tests for immunodiagnostic purposes. They are based on the detection of specific antibodies against the hydatid fluid, antigen B and antigen 5. Nevertheless, the use of these antigenic sources give rise to false positive and negative results. To overcome the problems with the diagnosis and the standardization of tests, recombinant proteins, monoclonal antibodies and other antigenic sources have been performed. These proteins may solve the problems associated with the use of conventional antigens in immunological assays.

Key words: Hydatidosis, *Echinococcus granulosus*, antigen, antibody, serodiagnose, sensitivity, specificity, ELISA, immunoblotting.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Echinococcus granulosus*

La hidatidosis o equinococosis quística es una enfermedad zoonótica con prevalencia mundial que afecta tanto a animales vertebrados como a seres humanos. Esta parasitosis es causada por los cestodos de la especie *Echinococcus granulosus sensu lato*. Estas tenias en su forma adulta suelen medir entre 2 y 7 milímetros de longitud y son parásitos del aparato digestivo de los vertebrados. [1] Morfológicamente se componen de un escólex y tres proglótides. El escólex a su vez está formado por cuatro ventosas dispuestas en cruz y una doble corona de ganchos con la que se fija a la mucosa intestinal, y las proglótides se dividen en inmadura, madura y grávida.[2] *E. granulosus* en su forma adulta parasita el intestino delgado del hospedador definitivo, lo que se conoce como equinococosis, mientras que en su fase larvaria conduce al desarrollo de quistes hidatídicos, principalmente en el hígado y en los pulmones de los hospedadores intermedios y el humano. En este momento se habla de hidatidosis.

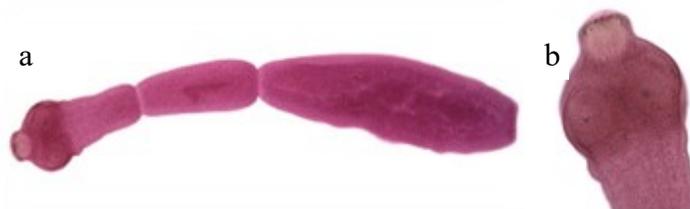


Figura 1: (a) Morfología completa de un adulto de *E. granulosus*. (b) Morfología del escólex de *E. granulosus*. [Ref. 1]

3.2 Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*

E. granulosus en su **forma adulta** habita en el intestino delgado de los perros y otros cánidos salvajes, como zorros o lobos, que actúan como hospedadores definitivos (1). El anillo grávido se desprende del gusano adulto y se descompone a lo largo del tránsito intestinal liberando sus **huevos**, que ya tienen capacidad infectiva. Estos huevos, de aproximadamente 30-40 μm de tamaño, son expulsados a través de las heces de los hospedadores definitivos (2) y pueden ser ingeridos de forma accidental por el ganado ovino y los animales ungulados (hospedadores intermedios). En el momento que estos huevos llegan al intestino, eclosionan y liberan las **oncosferas** (3), unas estructuras larvarias móviles que atraviesan la mucosa intestinal para acceder a la circulación porta o sistémica y asentarse principalmente en el **hígado** o en el **pulmón**, aunque también puede darse afectación renal, ósea, esplénica, muscular, ocular y del sistema nervioso central. Una vez las **formas larvarias** han alcanzado su localización definitiva desarrollan los **quistes hidatídicos**.

Cuando el hospedador definitivo ingiere vísceras de huéspedes intermedios contaminados con quistes hidatídicos, los protoescólex de los quistes hijos (6) migran hasta alcanzar la mucosa intestinal (7) donde se transforman en cestodos adultos (8) cerrándose así el ciclo del gusano. [1, 3]

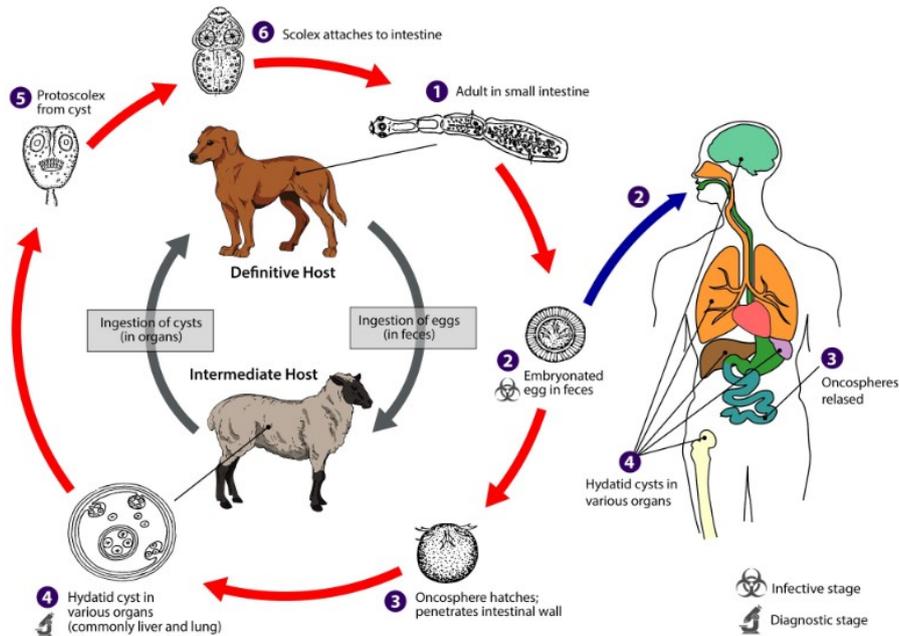


Figura 2: Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*. [Ref. 1]

3.3 Morfología y clasificación del quiste hidatídico

El tamaño del quiste varía entre 1-15 centímetros, aunque puede ser superior, con varios litros de líquido en su interior. [4] Es una estructura de crecimiento lento que se caracteriza por tener una forma esférica bien definida y un interior hueco relleno de un líquido claro denominado líquido hidatídico. El líquido hidatídico es una compleja mezcla de sales, lipoproteínas y otros compuestos orgánicos que son la principal fuente de antígenos para el inmunodiagnóstico. [5]

El quiste hidatídico se compone de tres capas. De externa a interna, las capas son las siguientes:

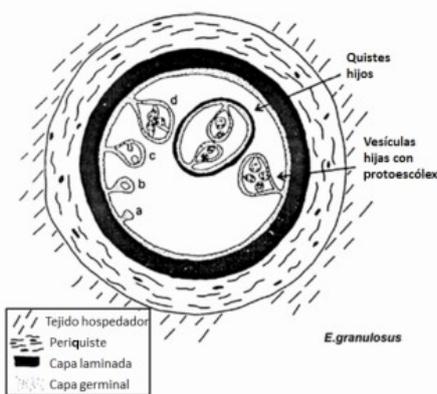


Figura 3: morfología del quiste hidatídico [Ref. 3]

- **Periquiste:** cubierta formada por tejido inflamado del hospedador.
- **Membrana laminada:** capa acelular que permite el paso de nutrientes al interior del quiste.
- **Membrana germinal:** estructura que permite el desarrollo de las vesículas hijas y en cuyo interior tiene lugar el proceso asexual de gemación que conduce a la formación de las formas larvianas o protoescolices.

Cuando las vesículas hijas se desprenden de la capa germinal se forman los **quistes hijos**, que ya albergan los protoescolices en su interior. [6]

La OMS/IWGE (Informal Working Group on Echinococcosis) ha realizado gracias a las técnicas de imagen una clasificación específica de las etapas del quiste en función de la actividad de la lesión:

- CE1: estado activo caracterizado por una pared formada por una doble membrana y arenilla hidatídica en el interior.
- CE2: estado activo consistente en múltiples vesículas hijas septadas o dispuestas en “panal de abejas”.
- CE3: lesión activa transicional unilocular caracterizada por el desprendimiento de la membrana laminar dentro del quiste.
- CE4: lesión inactiva heterogénea formado por el contenido degenerativo de las células hijas.
- CE5: lesión inactiva caracterizada por una calcificación total o parcial de la pared del periquiste. [7]

Esta clasificación ha sido utilizada para el diagnóstico y manejo clínico de la hidatidosis, ya que existe una estrecha correlación entre el nivel de IgG4 específica y la progresión de la enfermedad. [8] Únicamente los quistes en las etapas de desarrollo y crecimiento (CE1, CE2 y CE3) presentan una elevada seropositividad frente a esta subclase. Por el contrario, una elevada respuesta frente a IgG1, IgG2 e IgG3 se relaciona con los procesos de degeneración y calcificación del quiste (CE4 y CE5). [9]

3.4 Hidatidosis

3.4.1 Epidemiología

La hidatidosis es una severa zoonosis helmíntica mundialmente distribuida, aunque la prevalencia es mayor en las zonas rurales de la cuenca del Mediterráneo, el norte y este de África, oeste y centro de Asia, América del Sur y Australia. [10] Aunque la mortalidad de esta enfermedad no es muy elevada (2,2%), sí presenta una elevada morbilidad. Se estima que 2-3 millones de personas padecen hidatidosis, [3, 11] lo que supone un gran impacto económico.

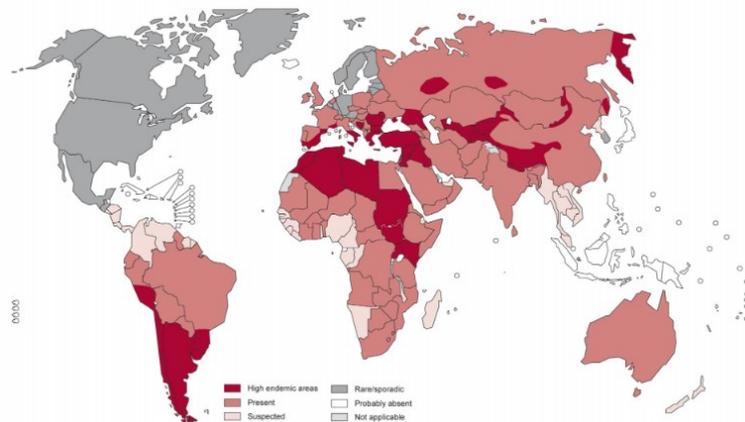


Figura 4: Epidemiología de la hidatidosis quística. [Ref. 12]

En España, la hidatidosis es considerada endémica. Afecta principalmente a las grandes áreas de pastoreo extensivo de ovinos en las regiones de Aragón, Castilla La Mancha, Castilla y León, Extremadura, Navarra y La Rioja. [13]

3.4.2 Aspectos generales de la enfermedad

El estudio molecular del ADN mitocondrial de *E. granulosus* ha permitido distinguir **10 genotipos** diferentes, que se diferencian fundamentalmente en la especificidad del hospedador, la morfología del adulto y la patogenicidad. En función del hospedador intermediario que parasita, se clasifican en: G1 y G2 (ovejas), G3 (búfalos), G4 (caballos), G5 (vacas), G6 (camellos), G7 y G9 (cerdos), G8 (ciervos) y G10 (renos), siendo G1 y G2 los causantes de la mayoría de los casos de hidatidosis. [14] En España se distinguen 3 cepas genéticamente diferentes dentro de esta especie: G1, G4 y G7. [15] Aunque el ciclo se desarrolla principalmente entre perro-oveja, puede estar también implicado el ganado equino, caprino, porcino o vacuno.

En humanos es una **enfermedad crónica** de complicado manejo clínico debido al crecimiento de quistes hidatídicos en el interior de distintos órganos vitales. Además, posee un **carácter prevenible**, ya que tanto los huéspedes definitivos como intermedios son domésticos. Sin embargo, se hace difícil la vigilancia debido a que el parásito posee un periodo de incubación de varios años, por lo que los sujetos pueden permanecer **asintomáticos** durante meses, años o incluso a lo largo de toda su vida. [12]

El método más frecuente de transmisión a humanos es por la ingesta de agua o alimentos contaminados con la materia fecal de un hospedador definitivo o por contacto directo con estos. Debido a que el ser humano no es capaz de transmitir la enfermedad, no se considera hospedador intermedio sino accidental. [1, 12]

Para reducir la transmisión, y por tanto la carga de morbilidad humana del cestodo, se deben realizar tratamientos periódicos vermífugos a perros y ovejas, mejorar de la higiene en los mataderos y efectuar campañas de educación pública. Como medida adicional se está evaluando la vacunación del ganado ovino con el antígeno recombinante *EG95* de *E. granulosus*. [1, 12]

3.4.3 Manifestaciones clínicas

Las técnicas de ultrasonido revelan que los quistes pueden llegar a crecer entre 1-50 milímetros al año. [7] La fase inicial de la enfermedad suele ser asintomática, ya que los quistes pequeños y bien encapsulados no suelen inducir manifestaciones clínicas. Cuando los quistes hidatídicos superan un determinado tamaño, estos ejercen presión sobre los tejidos adyacentes haciendo que la enfermedad se torne sintomática. Los signos dependen del órgano afectado, la cantidad y el tamaño de los quistes y la integridad de la pared quística.

La mayoría de los pacientes tienen una lesión quística que afecta a un solo órgano, siendo en el 70% de los casos el **hígado** y en el 20% el **pulmón**. [16] Por ello, las manifestaciones clínicas son principalmente hepáticas (dolor abdominal, náuseas y vómitos) o pulmonares (tos crónica, dolor torácico y disnea).

Entre los signos no específicos se encuentran anorexia, pérdida de peso y debilidad. Si se produce la ruptura del quiste, el líquido hidatídico se libera y puede desencadenar desde una reacción anafiláctica hasta incluso la muerte. [1]

3.4.4 Diagnóstico

Debido a la ausencia de signos patognomónicos es difícil diagnosticar la enfermedad, por lo que se estima que la hidatidosis está infra diagnosticada. Suele detectarse por casualidad o cuando aparecen complicaciones, principalmente mediante técnicas de imagen o hallazgos clínicos.

El diagnóstico de la hidatidosis se realiza mediante **pruebas de imagen**. Las técnicas de elección son: la ecografía abdominal, para quistes localizados preferentemente en esta región; la radiografía convencional, especialmente útil en lesiones pulmonares y óseas; y la tomografía computerizada y la resonancia magnética, para el estudio de quistes que no son accesibles mediante las técnicas anteriores. [3]



Figura 5: Quiste hidatídico pulmonar observado mediante radiografía de tórax. [Ref. 17]

No obstante, el potencial diagnóstico de estos procedimientos se encuentra limitado debido a la apariencia atípica de algunas lesiones, la incapacidad de discernir entre absceso o neoplasma y la insuficiente información que aportan algunas lesiones acerca de la especie o la viabilidad del parásito. Por ello, el diagnóstico de la infección debe confirmarse por **serología**, [18] basada en la detección de anticuerpos específicos o antígenos parasitarios en muestras biológicas.

Los ensayos inmunodiagnósticos habitualmente utilizados son ensayos inmunoenzimáticos (IgG-ELISA), el test de hemaglutinación indirecta (IHA) y el inmunoblotting (Western Blot), empleándose ELISA e IHA como primera línea e IB como test confirmatorio. [19] Además, puede confirmarse la presencia de protoescoléx a través de exámenes microscópicos histológicos y de fluidos.

La mayoría de métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos IgG específicos. Sin embargo, muchos estudios revelan una baja sensibilidad y especificidad frente a una misma secuencia, lo que lleva a considerar la serología frente al líquido hidatídico como un método con dudosos beneficios para el manejo clínico de la hidatidosis. Por ello, muchos autores se centran en el estudio de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos obtenidos a partir del antígeno B y el antígeno 5,

aunque hasta el momento se han obtenidos datos de sensibilidad y especificidad muy dispares para la misma secuencia. [25]

En la actualidad no existe un test serológico específico estandarizado y altamente sensible. En la práctica clínica, los resultados serológicos dependen de muchos factores como la calidad del antígeno, la técnica empleada, el órgano afectado, el número de quistes hidatídicos y la variabilidad de la respuesta inmune. Por estos motivos muchos laboratorios emplean como mínimo dos técnicas distintas en el diagnóstico rutinario.

3.4.5 Tratamiento

Actualmente no existe ningún criterio establecido en cuanto al tratamiento más eficaz de la hidatidosis. Evaluando la situación clínica del paciente y las características del quiste (tipo, tamaño y localización) se elige el más adecuado:

- El tratamiento **quirúrgico** es esencial frente a quistes de gran tamaño, especialmente si comprimen órganos cercanos, si son quistes con riesgo de rotura espontánea o secundaria a manipulación percutánea o si los quistes están asociados a roturas, fístulas, hemorragias o infecciones. [20]
- El **drenaje percutáneo** trata de destruir la capa germinal del quiste o vaciar su contenido. Esta técnica está especialmente indicada en pacientes inoperables o que sufren recidivas a pesar del tratamiento quirúrgico o farmacológico. Se lleva a cabo mediante el método PAIR: Punción del quiste, Aspiración del contenido hidatídico, Inyección de productos químicos escolicidas y Reaspiración. [20]
- En la **terapia cestodica** se emplean los **benzimidazoles** (albendazol como elección o mebendazol como alternativa). Este grupo de fármacos antihelmínticos pueden utilizarse como tratamiento único en quistes de menos de 5 cm o en pacientes inoperables. [7] También se emplean como tratamiento adicional a PAIR o en situaciones perioperatorias para evitar diseminaciones. Tienen una función ovicida, larvicida y tóxica para las formas adultas, ya que inhiben la función microtubular. No obstante, estos fármacos tienen una eficacia variable, ya que el principio activo debe atravesar la membrana del quiste y diluirse en su interior. [20]

4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es profundizar en las proteínas utilizadas en el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis, centrando el foco tanto en las fuentes antigénicas empleadas en el diagnóstico convencional como en las de reciente investigación. Estas últimas son la obtención y uso de antígenos procedentes de otros estadios del ciclo de vida del parásito y el desarrollo de secuencias recombinantes con características diagnósticas superiores a las de sus proteínas nativas homólogas. Como base del trabajo se quiere transmitir la necesidad de establecer una técnica diagnóstica estandarizada que reúna los requisitos de elevada sensibilidad y especificidad.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de lograr este objetivo, la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado a base de una amplia revisión bibliográfica de artículos encontrados en diversas bases de datos electrónicas como PubMed, Google Académico, Science Direct y SciELO. Además, se han consultado también publicaciones de páginas web de Organismos Internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centers for Disease Control and Prevention (CDC). La búsqueda se limitó a publicaciones escritas en inglés o castellano, de acceso libre o accesibles para el personal de la Universidad Complutense de Madrid.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El inmunodiagnóstico basado principalmente en la detección de antígenos circulantes en el suero o anticuerpos específicos frente a *E. granulosus* es un método complementario en el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, las técnicas de imagen son a menudo bastante caras e incluso en determinadas áreas no están disponibles a la totalidad de la población. En cambio, las técnicas serológicas son baratas y sencillas de realizar, por lo que cobran especial importancia en las zonas muy endémicas y en países en desarrollo.

6.1 Antígenos utilizados para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis

6.1.1 Antígenos del líquido hidatídico

La mayoría de los métodos serológicos usados en humanos para el diagnóstico de la hidatidosis se basan en la detección de anticuerpos IgG específicos, siendo tradicionalmente el líquido hidatídico (LH) la principal fuente antigénica empleada. [21] El LH es una compleja mezcla heterogénea, cuyos componentes mayoritarios son el antígeno 5 (Ag5) y el antígeno B (AgB). Estos tienen la capacidad de activar la respuesta humoral del huésped, por lo que son altamente inmunogénicos.

Aunque el LH posee una sensibilidad diagnóstica de entre el 85-95% [21], se encuentra muy limitado debido a dos grandes inconvenientes:

- ✚ El elevado número de falsos positivos detectados. Esto es debido a problemas de reactividad cruzada con sueros de pacientes con hidatidosis alveolar, cisticercosis, esquistosomiasis y fasciolosis. [22] Sin embargo, en España el serodiagnóstico basado en el LH bruto presenta menos inconvenientes que en otras regiones del mundo, en las que la hidatidosis alveolar y la cisticercosis son enfermedades endémicas. [23]
- ✚ El elevado porcentaje de pacientes serológicamente negativos frente al LH. Esto depende de diversos factores como la localización, estadio y tamaño del quiste y la variabilidad de la fuente antigénica empleada. [21]

La localización del quiste es la causa más importante de falsos negativos, ya que entre el 10-20% de pacientes con quistes hepáticos no presentan niveles significativos frente a IgG específicas. Del mismo modo, quistes con localización extrahepática inducen una baja o nula respuesta humoral frente al parásito. [24] Además, los distintos genotipos del parásito y las diferentes etapas quísticas poseen una expresión diferencial de antígenos, tanto cualitativa como cuantitativa.

Dependiendo de la etapa del quiste se expresa un perfil diferente de antígenos inmunodominantes: CE2 y CE3 muestran una elevada respuesta humoral frente al AgB y el Ag5, mientras que CE1, CE4 y CE5 reaccionan únicamente frente al Ag5 y la catepsina B. Estas diferencias podrían ser útiles en clínica para detectar correctamente las etapas del quiste y su viabilidad utilizando el antígeno más indicado para un diagnóstico específico. [25]

Debido a estas limitaciones, este extracto antigénico presenta dudosos beneficios en el serodiagnóstico de la enfermedad. Por ello, el LH bruto está especialmente recomendado en estudios seroepidemiológicos, [26] mientras que el diagnóstico individual de la hidatidosis se basa en la producción y el uso de fracciones purificadas de Ag nativos, Ag recombinantes y péptidos sintéticos. Se emplean principalmente el AgB y el Ag5, ya que son las lipoproteínas inmunogénicas más abundantes en el LH y se expresan durante todo el ciclo de la vida del parásito. [21]

6.1.2 Antígeno B

El AgB es una lipoproteína polimérica termoestable de 120-160 kDa que en condiciones reductoras se disocia en subunidades de 8/12, 16 y 20/24 kDa. [27] Aunque no se conoce a ciencia cierta la función del AgB, se cree que participa en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador, puesto que inhibe la actividad proteasa, inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos, induce la apoptosis de células inmunes, desencadena una respuesta Th2 no protectora y secuestra sustancias xenobióticas (nematicidas). [23]

Este antígeno está codificado por una familia multigénica de expresión variable constituida por 5 isoformas (*AgB1-AgB5*), [28] las cuales comparten entre ellas un 44-81% de similitud y se expresan de forma variable durante las distintas etapas de la vida del parásito y del quiste. A su vez, cada isoforma presenta homología con otras especies y géneros: más de un 90% de similitud con *E. multilocularis* y un porcentaje ligeramente menor con el género *Taenia*. [21] Debido a esta homología estructural se producen frecuentes reacciones cruzadas con sueros de pacientes infectados por otros helmintos.

Actualmente el método de mayor especificidad para el diagnóstico de la hidatidosis consiste en la identificación de la **subunidad 8/12 kDa** mediante inmunoblot. [29] No obstante, el 18% de los sueros de pacientes con hidatidosis no presentan niveles detectables de Ac específicos, mientras que el 39% de los sueros de pacientes con hidatidosis alveolar muestran reactividad cruzada con esta subunidad. [21, 30] De manera similar que al emplear LH, la sensibilidad de esta prueba se encuentra limitada por la localización extrahepática y el tamaño pequeño de los quistes.

El AgB ha sido obtenido y clonado tanto en su forma nativa purificada como recombinante. En los ensayos inmunodiagnósticos se han obtenido los siguientes resultados:

- El **AgB purificado** presenta una sensibilidad de entre 60-85% en ensayos ELISA, y de un 60-92% en inmunoblot. [21]
- La proteína recombinante (**rec**) **AgB1** ofrece una sensibilidad diagnóstica de un 71-94,6%. [23]
- La sensibilidad en ELISA basado en **recAgB2** o **recAg2B2** es del 51,8%. [31]

Esta heterogeneidad de valores de sensibilidad que ofrecen estas cuatro proteínas se explican con la enorme influencia que tienen algunos factores en la respuesta humoral del huésped:

- ✚ La composición específica antigénica de cada etapa del quiste. El AgB en ELISA evidenció una sensibilidad de 74%, 96%, 90% y 56% en pacientes con las etapas quísticas CE1, CE2, CE3 y CE4/CE5 respectivamente. [32, 33] Esto demuestra que la presencia de quistes simples o en etapas involutivas incrementa el número de falsos negativos.
- ✚ El elevado polimorfismo de los genes del AgB y la transcripción variable en función del genotipo de *E. granulosus*. Los genotipos distintos de G1 aumentan también los falsos negativos. [23]
- ✚ El tratamiento farmacológico, el cual incrementa el número de verdaderos positivos al provocar el derrame de Ag de los quistes dañados. [32, 34]

Las proteínas recombinantes **recAgB2** y **recAg2B2** consisten en una simple o doble repetición en tándem del AgB del genotipo G1 de *E. granulosus* sin el péptido señal, respectivamente. La sensibilidad de los test ELISA basados únicamente en estos antígenos recombinantes (ambos 51,8%) es más baja en comparación con los test basados en el LH (85-95%). [31] Sin embargo, la especificidad es superior, y por lo tanto la reactividad cruzada es menor en los test ELISA que emplean estos antígenos recombinantes frente a los que emplean LH. (Especificidad de 78%, 88,3%, 98,8% del LH, recAgB2 y recAg2B2 respectivamente; reactividad cruzada de 52,4%, 9,5% y 16,7% del LH, recAgB2 y recAg2B2 respectivamente). [34] Por ello, estos antígenos se emplean especialmente en pacientes que muestran lesiones similares a las características de la hidatidosis.

Antigen	Number of CE patients	Confirmatory test	Technique, antibody	Sensitivity (%)	Negative serology more frequent when
Purified	21	Surgery	Immunochromatography, IgG	100	Not specified
	23	Surgery	Immunochromatography, IgG4	95	Not specified
	5	Imaging techniques and serology*	ELISA, IgG	100	Not specified
	13	Serology*	ELISA, IgG	80	Not specified
	32	Imaging techniques	ELISA, IgG	0	CE4 and CE5 cyst stages
	40	Surgery	ELISA, IgG	93.8	CE4 and CE5 cyst stages
			ELISA, IgG4	87.5	Not specified
			ELISA, IgG4	80	Not specified
	108	Surgery	DIGFA, IgG	89.8	Cyst location other than liver; CE1, CE4, and CE5 cyst stages; small cysts
	113	Imaging techniques	DIGFA, IgG	92.9	Not specified
35	Imaging techniques	ELISA, IgG	54	CE1, CE4, and CE5 cyst stages	
56	Surgery	ELISA, all (Protein G)	96.9 ¹	Not specified	
			82.1 ²	Not specified	
Recombinant B1	31	Surgery	ELISA, all (Protein G)	71	Parasite genotype other than G1
	124	Surgery ⁵	ELISA, IgG	83	Not specified
	246	Imaging techniques	ELISA, all (Protein G)	77.6	Not specified
	113	Imaging techniques	DIGFA, IgG	77.9	Not specified
	56	Surgery	ELISA, all (Protein G)	94.6	Not specified
	123	Imaging techniques	ELISA, IgG	73.9	CE4 and CE5 cyst stages, no pretreatment
Recombinant B2	54 ²	Surgery	ELISA, IgG	77.8	Single cyst, no pretreatment
	186 ⁴	Surgery ⁵	ELISA, IgG	79	Not specified
Recombinant 2B2	54 ²	Surgery	ELISA, IgG	62.9	Single cyst, no pretreatment
	186 ⁴	Surgery	ELISA, IgG	92.6	Single cyst, no pretreatment
Recombinant B3	124	Surgery ⁵	ELISA, IgG	87.6	Not specified
	124	Surgery ⁵	ELISA, IgG	29	Not specified
Recombinant B4	124	Surgery ⁵	ELISA, IgG	75.8	Not specified
	36	Surgery	ELISA, IgG	91.7	Not specified
Recombinant B5	124	Surgery ⁵	ELISA, IgG	41.3	Not specified

Figura 6. Uso del antígeno B y sus derivados para el diagnóstico de la hidatidosis [Ref. 25]

6.1.3 Antígeno 5

El Ag5 es una lipoproteína termolábil, de aproximadamente 400 kDa y constituida por dos componentes de 57 y 67 kDa, que en condiciones reductoras se disocian en subunidades de 22-24 y 38 kDa. [35] Tampoco se conoce la función de esta molécula, sin embargo se cree que es esencial en el desarrollo del metacestodo debido a que se encuentra en elevada concentración en el LH. La subunidad de 22 kDa se relaciona con fenómenos de adhesión a la matriz extracelular y la superficie celular, mientras que la subunidad de 38 kDa se relaciona con la tripsina peptidasa, aunque no posee actividad enzimática. [36]

Se ha observado que el Ag5 también está codificado por una familia multigénica de expresión variable y que presenta, además, un 90% de homología estructural con moléculas expresadas por otros helmintos. Esto es en parte debido a que la subunidad 38 kDa está formada por fosforilcolina, un hapteno compartido por múltiples nematodos y que les confiere propiedades inmunorreguladoras. Por ello, este Ag presenta con mucha frecuencia reactividad cruzada con sueros de pacientes con hidatidosis alveolar o cisticercosis. [37]

La sensibilidad diagnóstica del **Ag5 nativo purificado** es del 50-87%. [37] Esta heterogeneidad de valores, como ya se ha mencionado anteriormente, es debido a que este Ag desencadena una respuesta humoral principalmente durante las etapas CE1 y CE5 del quiste, por lo que entre el 10-40% de los pacientes con hidatidosis quirúrgicamente confirmadas no presentan en ELISA niveles detectables de anticuerpos específicos. [38]

Además, aunque la subunidad 38 kDa es el componente más inmunogénico de la molécula, su antígeno recombinante **recAg53.38** presenta una sensibilidad demasiado baja (21%). [39]

Por todos los inconvenientes en cuanto a sensibilidad y especificidad del Ag5 y sus derivados, estos no se han ensayado con tanta frecuencia con fines diagnósticos como el AgB. [40] No obstante, la prueba de **doble difusión Arco 5** basada en la detección de anticuerpos frente al Ag5, se considera actualmente la prueba de referencia para el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis. [41] Es la prueba inmunodiagnóstica más empleada en las áreas donde la hidatidosis es endémica debido a la facilidad de su ejecución.

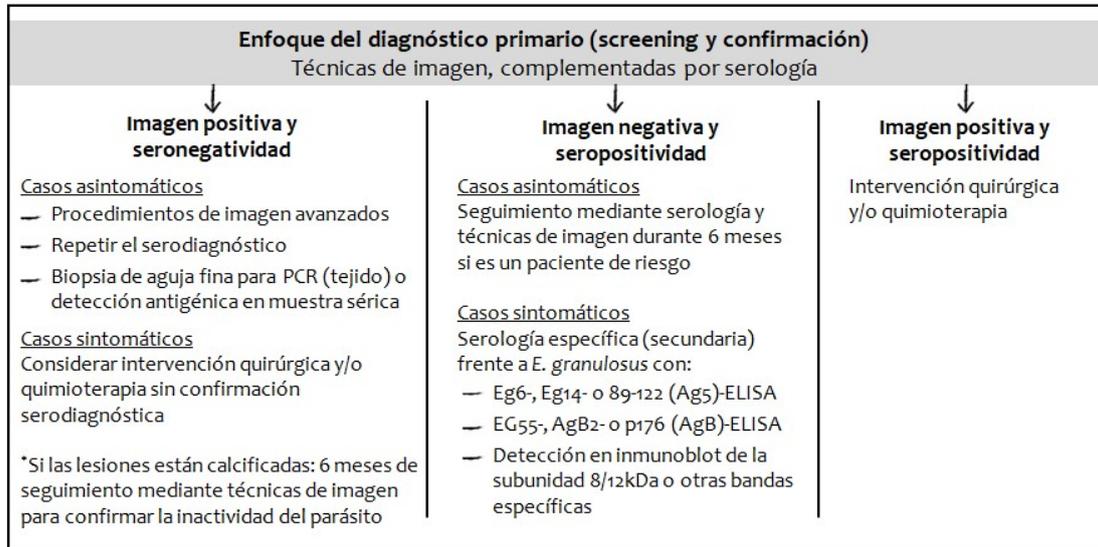


Figura 7. Recomendaciones para el diagnóstico de laboratorio de la hidatidosis. [Ref. 18]

Los inmunodiagnósticos convencionales se basan, por tanto, en el empleo de Ag somáticos que provienen principalmente del LH del parásito. Hasta el momento no existe ningún antígeno que aúne elevada sensibilidad y especificidad en la misma secuencia. Además, estos test fallan en la detección de un determinado porcentaje de pacientes afectados por *E. granulosus*, por lo que existe una creciente necesidad de optimizar el serodiagnóstico de la enfermedad.

6.2 Estandarización del serodiagnóstico de la hidatidosis humana

Los antígenos nativos y los recombinantes dan lugar a unos resultados muy variables en cuanto a sensibilidad y especificidad. Además de las causas mencionadas anteriormente, esto se debe a que para su estandarización deben ser obtenidos de infecciones naturales, por lo que cada lote tendrá una composición antigénica diferente. Esta variabilidad se atribuye también a que no existe un consenso en cuanto a los métodos de purificación de determinados antígenos. [42]

Con el fin de solucionar los problemas de estandarización antigénica, y tratar de mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico, se han desarrollado herramientas moleculares muy específicas, siendo las más relevantes los anticuerpos monoclonales, los antígenos purificados o recombinantes y la detección directa de DNA o RNA parasitario en las muestras mediante las técnicas Southern blot o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). [18]

Se han desarrollado **anticuerpos monoclonales** (MAbs, por sus siglas en inglés) dirigidos principalmente frente a los antígenos parasitarios AgB y Ag5 circulantes en el suero del enfermo.

- En primer lugar se desarrollaron los MAbs **24.14** y **61A12** frente al Ag5, y **31.35** y **39B3** frente al AgB^[36] para la detección de antígenos circulantes en suero. No obstante, la mayoría de pacientes con hidatidosis dan resultados negativos en ELISA, independientemente del estadio de la enfermedad, el momento de toma de muestra y la localización y fertilidad de los quistes. Además, estos MAbs detectan epitopos del AgB y Ag5 comunes a otros cestodos, por lo que no son específicos de *E. granulosus*.^[43]

ELISA basado en anti-Ag5 MAbs es capaz de detectar concentraciones muy bajas de Ag5 en el LH. Sin embargo, la prueba se ve limitada también debido a problemas de reacciones cruzadas, por lo que los MAbs **24.14** y **61A12** se emplean para la detección antigénica en biopsias de pacientes sospechosos de sufrir hidatidosis quística.^[14] Además, el MAb **24.14** muestra una sensibilidad del 92,8% en la detección de anticuerpos séricos en ensayos ELISA competitivo combinado con ELISA convencional, por lo que es un marcador temprano de infección.^[43]

- **E02 154/12** es otro MAb dirigido frente a Ag5. Se empleó para realizar un screening de la biblioteca de expresión de *E. granulosus*, aislandose así dos antígenos llamados **Eg6** y **Eg14**. Imitando el sitio conformacional de sus Ag recombinantes se sintetizó un péptido altamente específico y sensible para detectar Ac específicos mediante ELISA.^[44]
- Frente al AgB se desarrolló **C9E7H8**. Gracias a este MAb se consiguió aislar **EgPs-3**, un Ag recombinante, que debido a su peso molecular de 12 kDa, representa la subunidad pequeña del AgB. Cuando se emplea en ELISA como una proteína fusionada a la enzima Glutathion-S-Transferasa, presenta una sensibilidad diagnóstica del 74% y reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados por *E. multilocularis* y *Schistosoma japonicum*. Al combinar EgPs-3 con la proteína 65, el epitopo predominante reconocido por los anticuerpos específicos (**EgPs-3/65**), mejora la especificidad del ensayo, aunque su utilidad diagnóstica continúa estando limitada por su baja sensibilidad.^[45]
- También se ha obtenido un par de MAbs que reaccionan con otros antígenos parasitarios: el **4E5** reacciona con los Ag de la oncosfera, mientras que el **EF1bd** reconoce el factor de elongación 1 β / α , el cual se encuentra tanto en el LH como en el protoescólex. El Ag recombinante de esta última proteína se empleó en ELISA para la detección de una respuesta humoral específica. Se observó también que la concentración de los anticuerpos frente al EF1bd es superior en pacientes con calcificaciones en el quiste, por lo que es de gran utilidad para evaluar la viabilidad del quiste.^[14, 46]

Además de los MAb, se desarrollaron **péptidos recombinantes o sintéticos** derivados de secuencias antigénicas de *E. granulosus* procedentes del LH y otros extractos somáticos. Los Ag recombinantes se diseñan y obtienen en grandes cantidades, de forma estandarizada y homogénea, a partir de bacterias *Escherichia coli*. [42] Las muestras se extraen mediante una biopsia de aguja fina y las proteínas se detectan mediante una separación en gel de poliacrilamida. [14] A partir del AgB se han obtenido 3 proteínas:

- La proteína recombinante **EG55** se corresponde con la subunidad más pequeña del AgB y se expresó junto con la enzima Glutathion-S-Transferasa. Esta molécula fusionada presenta una elevada especificidad y sensibilidad en ELISA, del 99 y 89% respectivamente, por lo que podría ser útil en el serodiagnóstico. [47]
- A partir del AgB se obtuvo **rAgB-MBP**, un péptido recombinante fusionado con la proteína de unión a la maltosa (maltose-binding-protein o MBP). Se empleó para detectar anticuerpos IgG4 específicos en ELISA, mostrando una sensibilidad diagnóstica del 65% y problemas de reactividad cruzada únicamente con *E. multilocularis*. [48]
- A partir del AgB1 se obtuvo el **péptido p176**. Aunque el potencial diagnóstico de los péptidos sintéticos aislados es peor que el de la proteína original, tanto nativa como recombinada, la combinación de Ag junto con péptidos sintéticos reduce el número de falsos negativos, y por tanto, mejora la especificidad del inmunoensayo. [49]

El protoescólex y las formas adultas constituyen otra fuente antigénica adicional al LH con relevancia en el serodiagnóstico de la hidatidosis. A partir de estos extractos somáticos se han desarrollado **antígenos recombinantes** (rEpC1 y rEgcMDH) con un elevado potencial diagnóstico, a pesar de presentar también reactividad cruzada con sueros infectados por otros parásitos (debido a la heterogeneidad del extracto) y problemas por el diagnóstico de falsos negativos.

- La proteína recombinante **rEpC1** es una secuencia de 8,4kDa obtenida a partir de una biblioteca de cDNA de protoescólex de *E. granulosus*. Este polipéptido presenta una especificidad y sensibilidad de 92 y 83-96% respectivamente. [50]
- Por otro lado, **rEgcMDH** es una isoforma de la enzima malato deshidrogenasa aislada en el citosol del parásito adulto. Esta proteína presenta una especificidad y sensibilidad de 45-90 y 83-95% respectivamente. [51]

6.3 **VIRapid® HYDATIDOSIS**

Muchas fracciones antigénicas de *E. granulosus* se han ensayado para mejorar la sensibilidad y especificidad de los test serológicos empleados en el diagnóstico de la hidatidosis. Las preparaciones más exitosas son las enriquecidas con fracciones 5 y B, puesto que la purificación del antígeno mejora la especificidad sin disminuir la sensibilidad de los test. [52]

Basándose en esto, en un **antígeno enriquecido *E. granulosus* 5/B y purificado por HPLC** (high performance liquid chromatography), la empresa Vircell comercializó en España VIRapid® HYDATIDOSIS, el primer test inmunocromatográfico para el diagnóstico de la hidatidosis. Este test rápido, empleado para la detección cualitativa de anticuerpos específicos totales en suero o plasma humano, ofrece una sensibilidad del 94,7% y una especificidad del 99,5%, obtenidas tras el ensayo de 282 muestras, de las cuales no se especifican detalles. [53]

Aunque VIRapid® HYDATIDOSIS demuestra una buena precisión diagnóstica, no supera desde el punto de vista estadístico los resultados obtenidos con ELISA IgG *Echinococcus*. [54] No obstante, debido a la rapidez y sencillez de realización e interpretación, su bajo costo, su estabilidad a temperatura ambiente y la posibilidad de realizar la prueba en el mismo sitio donde se atiende al paciente, [45] es un método idóneo en áreas en desarrollo y como test de screening en diagnósticos rutinarios.

7. CONCLUSIONES

La hidatidosis es una grave zoonosis parasitaria causada por el estado larvario de *Echinococcus granulosus*. La enfermedad puede tener consecuencias fatales si no se trata adecuadamente, por lo que el diagnóstico prematuro es crucial para el tratamiento eficiente y el pronóstico de la enfermedad.

El diagnóstico de la hidatidosis se realiza mediante técnicas de imagen y se complementa con serología. En el inmunodiagnóstico convencional se ha empleado el líquido hidatídico bruto y las fracciones purificadas del antígeno B y el antígeno 5. Sin embargo, se obtienen datos de sensibilidad y especificidad dispares para un mismo antígeno debido a problemas de reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados por otros helmintos, la localización extrahepática del quiste, genotipos de *E. granulosus* distintos de G1, quistes en etapas CE1, CE4 y CE5, y quistes de pequeño tamaño, entre otros.

Esta falta de antígenos con propiedades diagnósticas elevadas en una misma secuencia y que, además, cuenten con procesos de obtención fácilmente estandarizables, ha llevado a muchos investigadores a buscar alternativas con resultados muy prometedores, entre las que se encuentran la obtención de antígenos procedentes de otras etapas de desarrollo del parásito (**rEpC1 y rEgcMDH**), el estudio de secuencias recombinantes con características diagnósticas superiores a las de sus proteínas nativas homólogas (**Eg6, Eg14 y EG55**) y el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos (**24.14, 61A12, 4E5 y EF1bd**).

No obstante, debido a los valores tan amplios de sensibilidad y especificidad dentro de una misma secuencia, algunos investigadores proponen el uso de estas secuencias recombinantes o de fracciones purificadas, en combinación con otras (**antígeno 5/B de ViRapid® HYDATIDOSIS**), con la finalidad de mejorar el potencial inmunodiagnóstico de la hidatidosis.

Actualmente estos rápidos avances en el diagnóstico de la hidatidosis se encuentran limitados debido a su elevado coste y la complejidad de los métodos. Por este motivo, aunque la estandarización y comercialización de los nuevos antígenos es esencial para el

desarrollo y mejora del serodiagnóstico de la hidatidosis, en cuanto a una detección más fiable del parásito, una correcta caracterización de lesiones hidatídicas, la detección de casos asintomáticos y la caracterización de la etapa de desarrollo del quiste, hasta el momento **no existe ninguna técnica estandarizada** que reúna sensibilidad/especificidad diagnóstica elevadas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – Parasites – Echinococcosis [Internet] [Citado 18 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/>
- [2] Córscico, B. Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. [Internet] [Citado 18 de marzo de 2020] Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38338/Documento_completo.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- [3] Uribarren Berrueta, T. Hidatidosis. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. [Internet] [Citado 18 de marzo de 2020] Disponible en: http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=1926
- [4] Eckert JGM, Meslin FX, Pawlowski ZS, editors. WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: World Health Organization for Animal Health, 2001.
- [5] Rogan MT, Hai WY, Richardson R, Zeyhle E, Craig PS. Hydatid cysts: does every picture tell a story? Trends in Parasitology. 2006; 22, 431-438.
- [6] Armiñanzas, C. Gutiérrez-Cuadra, M. Fariñas, M. Hidatidosis: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital U. Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria Santander.
- [7] Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Trop 2010; 114:1-16.
- [8] Sambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically exoressed cystic echinococcosis patients. Acta Trop. 1997; 64(1-2):53-63.
- [9] Daeki AO, Craig PS, Shambesh MK. IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. Ann Trop Med Parasitol. 200; 94(4):319-28.
- [10] McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. The Lancet. 2003; 362, 1295-1304. Review.
- [11] Craig PS, McManus DP, Lightowers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. Lancet Infect Dis 2007; 7: 385-94.
- [12] World Health Organisation (WHO) – Equinococcosis [Internet] [Citado 24 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>

- [13] Carmena D, Sánchez-Serrano LP, Barbero-Martínez I. (2008). Echinococcus granulosus infection in Spain. Zoonoses and Public Health. 2008; 55: 156-165.
- [14] Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus Trends Parasitol 2002; 18: 452-7.
- [15] Siles-Lucas M, Cuesta Bandera C. Caracterización de diferentes cepas de Echinococcus granulosus en España por SDS-PAGE. Hidatidología. 1992; 6: 55-59.
- [16] Journal of clinical Microbiology. American Society for Microbiology – Cystic Echinococcosis [Internet] [Citado 20 de marzo de 2020] Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/54/3/518#sec-3>
- [17] Vola A, Manciulli T, De Silvestri A, Lissandrin R, Mariconti M, Siles-Lucas M, Brunetti E, Tamarozzi F. Diagnostic Performances of Commercial ELISA, Indirect Hemagglutination, and Western Blot in Differentiation of Hepatic Echinococcal and Non-Echinococcal Lesions: A Restrospective Analysis of Data from a Single Referral Centre. Am J Trop Med Hyg 2019; 101: 1345-49.
- [18] Siles-Lucas M, Gottstein B. Molecular tolols for the diagnostic of cystic and alveolar echinococcosis. Tropical Medicine and International Health 2001; 6: 463-75.
- [19] Fernández-García P, Marco-Doménech S, Piqueras-Olmedo R. Radiografía de tórax. Servicio de Radiodiagnóstico, Hospital General Castellón. Medicina Integral 2000.
- [20] Arif SH, Shams-Ul-Bari NA, Zargar SA, Wani MA, Tabassum R, Hussain Z et al. Albendazole as an adjuvant to the standard surgical management of hydatid cyst liver. Int J Surg 2008; 6: 448-51.
- [21] Carmena D, Benito A, Eraso E. Avances recientes en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. Enfermedades infecciosas, Microbiología Clínica 2007; 25(4):263-9.
- [22] Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological and clinical aspects os echinococcosis and management. Surg Today. 2004; 34:987-96.
- [23] Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clinical and Developmental Immunology 2012.
- [24] Orduña A, Zarzosa P, Abad R, Bratos MA, Sainz M, Gutiérrez P, et al. Influence os factors related to cyst in the sensitivity of six serological tests for diagnosis of human hydatid disease. Arch Int Hidatid. 1997; 32:280-6.
- [25] Manzano-Román R, Sánchez-Ovejero C, Hernández-González A, Casulli A, Siles-Lucas M. Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future? 2015
- [26] Eckert J, Gemmell MA, Meslin F, Pawlowski Z, editors. WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problema of global concern. Paris: WHO/OIE; 2001.
- [27] Oriol R, Williams JF, Pérez Esandi MV, Oriol C. Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. Am J Trop Med Hyg. 1971; 20:569-74.

- [28] Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, Ayala FJ. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene*. 2004; 333:157-67.
- [29] Ortona E, Riganò R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, et al. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol*. 2000; 22:553-9.
- [30] Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VCW. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40:377-83.
- [31] Barbieri M, Fernández V, González G, Martínez V, Nieto A. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol*. 1998; 20:51-61.
- [32] Hernández-González A, Muro A, Barrera I, Ramos G, Orduña A, Siles-Lucas M. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:147-53.
- [33] Li T, Ito A, Chen X, et al. Specific IgG responses to recombinant antigen B and Em18 in cystic and alveolar echinococcosis in China, *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010; 17(3):470-475.
- [34] Hernández-González A, Sánchez-Ovejero C, Manzano-Román R, Siles-Lucas M, et al. Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients. 2018.
- [35] Lightowlers MW, Liu DY, Haralambous A & Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1989; 37:171-182.
- [36] Lorenzo C, Salinas G, Brugnini A, Wernstedt C, Hellman U, González-Sapienza G. *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases on the trypsin family. *Biochem J*. 2003; 369:191-8.
- [37] Shepherd JC, McManus DP. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 25:143-54.
- [38] Schantz PM, Gottstein B. *Echinococcosis (hydatidosis)*, Academic Press Inc; 1986.
- [39] Pagnozzi D, Biossa G, Addis MF, Mastrandrea S, Masala G, Uzzau S. An easy and efficient method for native and immunoreactive *Echinococcus granulosus* antigen 5 enrichment from hydatid cyst fluid. *PLoS ONE*. 2014
- [40] Auer H, Stöckl C, Suhendra S, Schneider R. Sensitivity and specificity of new commercial tests for the detection of specific *Echinococcus* antibodies. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2009; 121: 37-41.
- [41] Coltori E, Varela-Díaz V. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 72:3
- [42] Hernández-González A. Validación de un nuevo antígeno recombinante para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con hidatidosis y su aplicación a un test comercial. 2012

- [43] Liu D, Rickard MD, Lightowers MW. Analysis of taeniid antigens using monoclonal antibodies to Echinococcus granulosus antigen 5 and antigen B. Parasitology Research. 1993; 79:82-85.
- [44] Chamekh M, Facon B, Dissous C, Haque A & Capron A. Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of Echinococcus granulosus antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. Journal of Immunological Methods. 1990; 134:129-37.
- [45] Leggatt GR, McManus DP. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from Echinococcus granulosus (hydatid disease) cyst fluid. Parasite Immunology. 1994; 16:87-96.
- [46] Craig PS, Macpherson CN & Nelson GS. The identification of eggs of Echinococcus by immunofluorescence using a specific anti-oncospherical monoclonal antibody. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1986; 35: 152-158.
- [47] Helbig M, Frosch P, Kern P & Frosch M. Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. Journal of Clinical Microbiology. 1990; 31: 3211-15.
- [48] McVie A, Ersfeld K, Rogan MT, Craig PS. Expression and immunological characterisation of Echinococcus granulosus recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. Acta Tropica. 1997; 67:19-35.
- [49] Lightowers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of Echinococcus granulosus. Mol Biochem Parasitol. 1989; 37:171-82.
- [50] Li J, Zhang W-B, Wilson M, Ito A, McManus DP. A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. J Infect Dis. 2003; 188:1951-60.
- [51] Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potencial for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin Exp Immunol. 2003; 132:309-15.
- [52] Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio M, Osuna A. Pre- and Postsurgical Detection of IgG, IgM and IgA Specific to Hydatidosis by ELISA With Purified Antigen Enriched with the 5/B Antigen Complex. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2002; 16:295-8.
- [53] VIRapid® HYDATIDOSIS [Internet] [Citado 30 abril de 2020] Disponible en: <https://www.vircell.com/producto/virapid-hydatidosis/>
- [54] Astudillo O, Brava A. Evaluación de la prueba rápida VIRapid® HYDATIDOSIS. Acta bioquímica clínica latinoamericana. 2018; 52:3